

## ÉTUDE ULTRASTRUCTURALE DES ASQUES ET DES ASCOSPORES DE TRUFFES DU GENRE *TUBER*

### I. LES ASQUES

par A. PARGUEY-LEDUC et M.C. JANEX-FAVRE\*

**RÉSUMÉ.** - L'organisation des asques présente une grande homogénéité chez les espèces de Truffes étudiées (*Tuber aestivum*, *T. bituminatum*, *T. dryophilum*, *T. excavatum*, *T. melanosporum*, *T. mesentericum*, *T. rufum*). Les caractères les plus originaux de ces asques sont: - leur forme globuleuse; - l'existence de polarités successives dans la répartition de leurs constituants internes; - le mode de délimitation individuel de leurs ascospores; - la présence d'un sac post-sporal autour de ces ascospores.

**SUMMARY.** - Ultrastructural studies of asci and ascospores in Truffles (g. *Tuber*). I. The asci. - In the species of *Tuber* here studied (*Tuber aestivum*, *T. bituminatum*, *T. dryophilum*, *T. excavatum*, *T. melanosporum*, *T. mesentericum*, *T. rufum*), the ascus organization is homogeneous. The most original features of the asci are: - a globular shape; - successive polarities in the components distribution; - individual process of ascospore delimitation; - occurrence of a post-sporal membrane surrounding the ascospores.

Ayant eu la possibilité d'effectuer des observations chez diverses Truffes du g. *Tuber* (*Tuber aestivum*, *T. bituminatum*, *T. dryophilum*, *T. excavatum*, *T. melanosporum*, *T. mesentericum*, *T. rufum*), nous nous proposons, au terme de notre étude - dont certains résultats ont déjà été publiés (JANEX-FAVRE et PARGUEY-LEDUC, 1976; PARGUEY-LEDUC et JANEX-FAVRE, 1977 a et b; JANEX-FAVRE, 1977; JANEX-FAVRE et PARGUEY-LEDUC, 1980) - de comparer ces diverses espèces entre elles, quant à la structure de leurs asques et de leurs ascospores, en microscopie électronique.

\* Laboratoire de Cryptogamie, Université Pierre et Marie Curie; 9 quai Saint-Bernard, 75005 Paris.

## 1. FORMATION DES ASQUES

Les asques se forment à l'extrémité de filaments ascogènes dicaryotiques dont la cellule terminale se transforme en cellule ascogène. Selon la règle, celle-ci forme un bec, puis une anse (fig. 1 et 2) par laquelle le noyau du bec va rejoindre celui de la cellule sous-jacente (= cellule-pied). Cette dernière, ainsi que le bec, a un contenu très clair et très vacuolisé. Au contraire, la cellule pro-ascale terminale apparaît beaucoup plus sombre. Elle renferme, outre ses deux noyaux, diverses inclusions, réparties irrégulièrement, parmi lesquelles des vacuoles, peu nombreuses et de taille inégale, quelques globules lipidiques et des vésicules à contenu moyennement dense aux électrons. Sur les cloisons séparant la cellule pro-ascale du bec ou du pied sont parfois visibles des corps synaptiques très denses aux électrons (fig. 2). La paroi de la cellule pro-ascale, peu épaisse, comporte un exoascus mince et sombre et un endoascus plus épais et plus clair.

Ensuite la cellule pro-ascale commence à s'élargir et une zonation horizontale de ses constituants apparaît, variable selon les espèces. Chez le *Tuber rufum* (fig. 3) la partie sommitale de la cellule pro-ascale est essentiellement occupée par de nombreuses et volumineuses mitochondries à longues crêtes parallèles. Sa partie basale renferme les deux noyaux, des vacuoles, petites et plus ou moins confluentes, et des globules lipidiques. D'autres vacuoles sont réparties dans tout le volume de la cellule pro-ascale. De volumineux lomasomes y sont également visibles. Chez le *Tuber excavatum* (fig. 4) la partie sommitale de la cellule pro-ascale, beaucoup plus claire, est pratiquement remplie de très volumineuses vacuoles.

## 2. L'ASQUE AVANT L'ASCOSPOROGENESE

a) L'élargissement de la cellule pro-ascale s'étant poursuivi, le jeune asque devient approximativement globuleux (fig. 5 et 6), avec un pied, plus ou moins marqué selon les espèces. Les deux noyaux du dicaryon fusionnent en un noyau unique, diploïde, situé au sein d'une zone cytoplasmique périnucléaire assez dense aux électrons. En dehors de cette zone la polarité de répartition des constituants disparaît; les vacuoles se dispersent dans tout le volume de l'asque; entre elles sont reconnaissables des rosettes de glycogène.

b) Par la suite, une accumulation continue de glycogène se produit dans l'asque, au détriment des vacuoles (fig. 7). Les rosettes présentent souvent une disposition rayonnante autour des plages vacuolisées. En même temps la paroi ascale s'épaissit, sans que sa constitution soit modifiée (fig. 8).

c) Ensuite le noyau de fusion migre dans la partie sommitale de l'asque (fig. 9). Corrélativement une nouvelle polarité de répartition des constituants s'établit. Les vacuoles se localisent principalement autour du noyau, dans le tiers supérieur de l'asque, tandis que le glycogène est très abondant dans tout le reste de l'asque.

d) Le noyau de fusion subit une première division (fig. 10). Les deux noyaux qui en résultent, entourés d'une zone péri-nucléaire commune, se situent tout au sommet de l'asque, très près du plasmalemme. Corrélativement apparaît dans chaque vacuole un volumineux globule, très dense aux électrons (= sans doute un granule métachromatique).

De plus, chez quelques espèces (*Tuber aestivum*, *T. rufum*, et surtout *T. mesentericum*) il se forme au sommet de l'asque une calotte apicale : différenciée à partir de lomasomes, cette calotte double intérieurement, à très faible distance, le plasmalemme sommital. Elle est constituée de deux feuillets, très proches l'un de l'autre mais bien distincts sur ses bords où ils s'écartent, ce qui leur donne, en coupe, l'aspect d'une ampoule (fig. 10, 11 et 12).

### 3. L'ASQUE AU MOMENT DE L'ASCOSPOROGENESE

Les futurs noyaux sporaux sont formés à la suite d'une ou de deux divisions nucléaires supplémentaires. Ils se répartissent dans toute la zone sommitale, où se localisent les vacuoles à précipités. Entourés chacun d'une zone périnucléaire propre, ils demeurent proches du plasmalemme (fig. 13).

Lors de l'ascosporogénèse, un sac pro-sporal se forme autour de chacun des noyaux. Il est constitué par un simple feuillet issu d'un lomasome générateur, différencié sur le trajet du plasmalemme (fig. 14). La transformation du sac pro-sporal en paroi ascosporale, puis l'évolution de celle-ci seront détaillées dans la seconde partie de ce travail.

### 4. L'ASQUE AU STADE SUB-ADULTE

Après leur délimitation, les ascospores, au nombre de trois à cinq, se regroupent au centre de l'asque, où elles sont entourées par un sac post-sporal. Déjà observée chez le *Tuber aestivum* et le *Tuber rufum* (PARGUEY-LEDUC et JANEX-FAVRE, 1977 a) cette formation très originale a été retrouvée chez toutes les espèces examinées (fig. 15 à 19).

Le sac post-sporal (flèches) sépare l'épiplasme en deux régions concentriques. D'aspect très différent, la région interne, qui contient les ascospores, apparaissant généralement plus claire que la région externe. Cette dernière contient essentiellement du glycogène, qui tend d'ailleurs à disparaître au cours de la maturation de l'asque. L'épiplasme interne, dépourvu de glycogène, renferme des éléments du réticulum endoplasmique et des masses irrégulières, opaques aux électrons, qui sont probablement constituées par des substances en voie de lyse (fig. 17).

### 5. L'ASQUE ADULTE

A l'état adulte, l'asque demeure limité par une paroi peu épaisse, formée

de deux couches dont l'externe (= exoascus) tend à disparaître.

En même temps que le volume des ascospores augmente le sac post-sporal, qui les contient, doit également s'accroître; il se trouve ainsi progressivement repoussé vers la périphérie de l'asque. L'accroissement du sac résulte de l'incorporation d'éléments du réseau endoplasmique (fig. 20).

Le sac post-sporal présente fréquemment, sur sa face externe, des globules de taille variable, moyennement denses aux électrons et irrégulièrement répartis (fig. 15, 17 et 21). Sur les coupes traitées par la technique de Thiéry (fig. 21) la surface de ces globules est soulignée par un liseré plus opaque aux électrons. Ces globules semblent se former à l'intérieur de certaines ampoules du réseau endoplasmique puis s'accoler au sac et le traverser (fig. 22). Ils peuvent demeurer indépendants (fig. 21) ou confluer entre eux et former une masse sphérique, parfois très volumineuse (fig. 17).

Lorsque les asques commencent à dégénérer, alors que le sac demeure très net, des résidus de la lyse des divers constituants se groupent sur la face externe de celui-ci (fig. 18 et 23); ils s'ajoutent ainsi aux globules précédemment décrits.

## CONCLUSION

Chez les Truffes, l'organisation de l'asque présente une grande homogénéité. Si certains de ses caractères sont ceux de la majorité des Ascomycètes, d'autres, par contre, sont originaux. Parmi ces derniers, on doit noter :

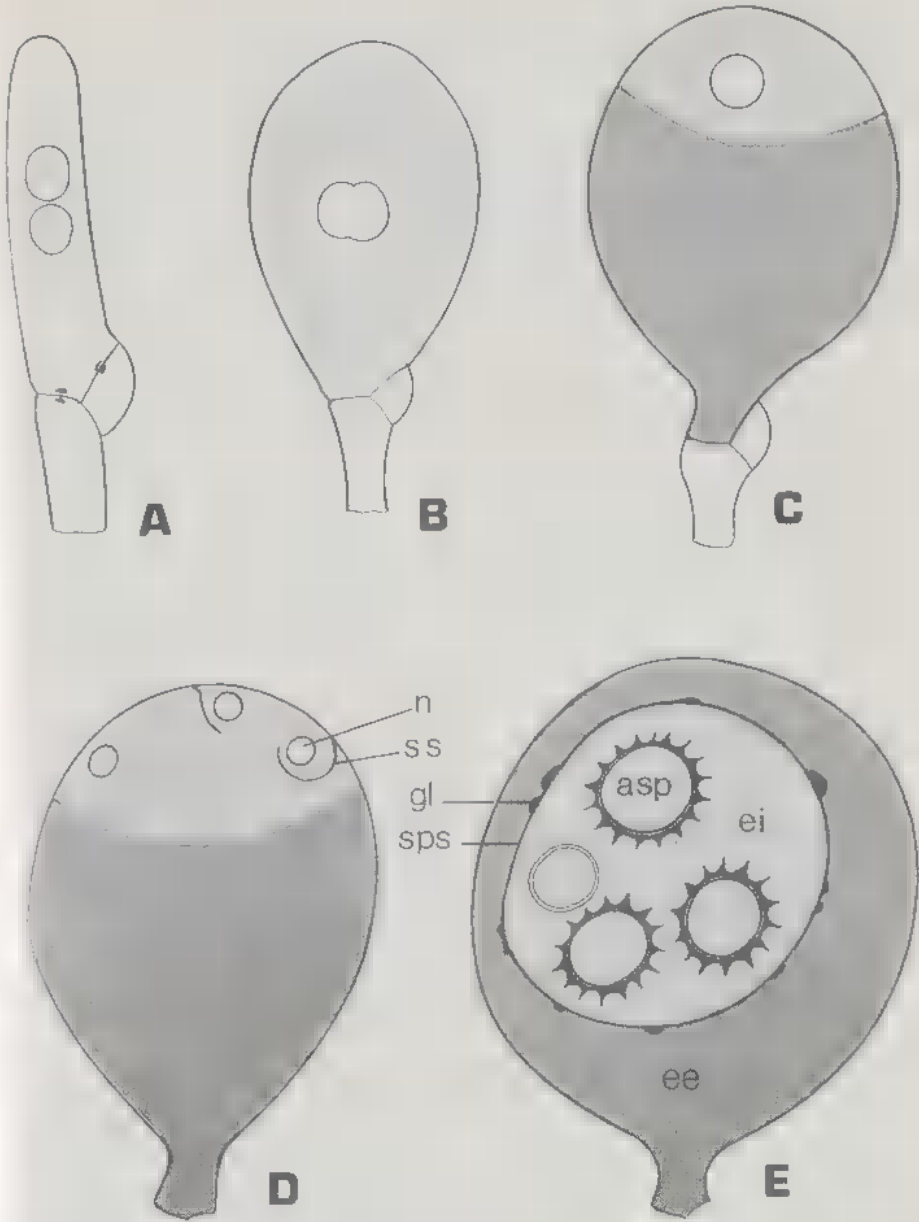
### 1) La forme globuleuse du corps de l'asque.

Caractéristique de quelques Tubérales, du genre *Tuber* en particulier, elle n'est pas réalisée d'emblée. En effet la cellule pro-ascale issue, de façon classique, d'une dangeardie ascogène, est primitivement cylindrique et elle ne se renfle que secondairement, au moment de la fusion des noyaux du dicaryon.

### 2) La polarité dans la répartition des constituants internes (schémas).

La cellule pro-ascale présente une zonation horizontale, qui disparaît dans le jeune asque, au moment de la fusion des noyaux, mais réapparaît après la migration du noyau de fusion au sommet de l'asque. Deux zones superposées sont alors remarquablement distinctes. La zone sommitale renferme le noyau de fusion, entouré par un cytoplasme à nombreuses petites vacuoles. Dans la zone inférieure s'accumulent des réserves, sous forme de rosettes de glycogène tassées les unes contre les autres.

Une polarité différente s'établit après la migration des ascospores vers le centre de l'asque et la formation du sac post-sporal. Les constituants sont alors répartis en zones concentriques. De l'extérieur vers l'intérieur de l'asque se succèdent: la paroi ascale, l'épiplasme externe, le sac post-sporal et l'épiplasme interne.



Evolution des ascus de Truffes: modifications de la polarité des constituants. — A, cellule pro-ascogone à zonation horizontale; B, jeune ascus au moment de la fusion des noyaux: disparition de la polarité; C, ascus uninucléé: zonation horizontale; D, ascus au moment de l'ascosporogénèse: zonation identique (n: noyau; ss: sac pro-ascogone); E, ascus adulte à zonation concentrique (asp: ascospore; ee: épiplasma externe; ei: épiplasma interne; gl: globule du sac; sps: sac post-spore).

### 3. Le mécanisme de l'ascosporogénèse.

Il présente des caractères remarquables. Les divisions du noyau de l'asque donnant les futurs noyaux sporaux se produisent toujours dans la zone sommitale de l'asque, lorsque se sont formés dans les vacuoles les précipités métachromatiques. Ensuite, contrairement à ce qui se passe classiquement chez les Eu-Ascomycètes, les ascospores sont délimitées, non pas à partir d'une vésicule ascale, mais individuellement, comme c'est le cas chez les Héli-Ascomycètes. En effet chaque futur noyau sporal est entouré par un sac pro-sporal, qui est formé par des diverticules issus de lomasomes et devient ensuite la paroi primordiale d'une ascospore.

Au stade adulte les asques ne renferment jamais huit ascospores mais un nombre inférieur, variable et allant de un à cinq, rarement six.

### 4. La présence d'un sac post-sporal.

Fine membrane développée autour de l'ensemble des ascospores après leur regroupement au centre de l'asque, cette formation est tout à fait originale. Elle partage l'épipleme en deux régions très différentes, l'externe contenant les réserves, principalement sous forme de glycogène et l'interne, où se trouve le réticulum endoplasmique. L'origine du sac post-sporal n'a pu être déterminée, mais le réseau endoplasmique joue un rôle important dans l'accroissement de ce sac et la formation de ses globules.

### REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement R. CAILLEUX, G. CHEVALIER, B. DARCHEN, H. FROCHOT, F. MAGNE et G. MALENÇON de nous avoir procuré et déterminé les Truffes utilisées pour ce travail, et nous avons plaisir à rappeler la précieuse collaboration technique de C. BIDOUX, C. FOURNIGAULT et N. JAMPSIN.

### BIBLIOGRAPHIE

- JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1976 - La formation des ascospores chez deux Truffes: *Tuber rufum* Pico et *Tuber aestivum* Vitt. (Tubéracées). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 283: 1173-1175.
- JANEX-FAVRE M.C., 1977 - La paroi des ascospores du *Tuber rufum* Pico. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 93: 407-424.
- JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1980 - Formation et évolution des ascospores du *Tuber mesentericum* Vitt. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 96: 225-237.
- PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1977a - L'organisation des asques de deux Truffes: *Tuber rufum* Pico et *Tuber aestivum* Vitt. *Rev. de Mycol.* 41: 1-32.
- PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1977b - L'ornementation des ascospores chez le *Tuber aestivum* Vitt. *Société française de Phytopathologie*, Travaux dédiés à G. VIENNOT-BOURGIN, 307-323.

## LÉGENDES DES FIGURES

Pour toute cette étude nous avons utilisé la double fixation par le glutaraldéhyde, puis le tétraoxyde d'osmium; les coupes ont été contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, ou traitées par la technique de Thiéry (fig. 12, 14 et 21).

Fig. 1 et 2. — Formation des asques au moyen de dangeardies ascogènes: cellule pro-ascale binucléée, cellule-pied et bec. 1: *Tuber mesentericum*. 2: *Tuber melanosporum*. Échelle: 1  $\mu$ m.

Fig. 3 et 4. — Évolution de la cellule pro-ascale: élargissement et zonation horizontale des constituants internes. 3: *Tuber rufum*. 4: *Tuber excavatum*. Échelle: 1  $\mu$ m.

Fig. 5 et 6. — Jeune asque globuleux; en 5 sont encore visibles la cellule-pied et le bec. 5: *Tuber melanosporum*. 6: *Tuber dryophilum*. Échelle: 1  $\mu$ m.

Fig. 7 et 8. — Jeune asque, au moment de l'accumulation du glycogène; en 8, détail de la paroi ascale: exoascus, endoascus et plasmalemme distincts. 7: *Tuber rufum*, échelle: 1  $\mu$ m. 8: *Tuber bituminatum*, échelle 0,5  $\mu$ m.

Fig. 9 et 10. — Jeune asque, avec zonation horizontale de son contenu. En 9: noyau en fusion dans la zone sommitale vacuolisée, surmontant la zone à glycogène. En 10: le noyau s'est divisé, les vacuoles contiennent chacune un globule dense aux électrons; la cellule apicale est visible. 9: *Tuber aestivum*. 10: *Tuber mesentericum*. Échelle: 2  $\mu$ m.

Fig. 11 et 12. — Détails de la calotte apicale. 11: *Tuber rufum*; 12: *Tuber mesentericum*. Échelle: 0,5  $\mu$ m.

Fig. 13. — Asque au moment de l'ascosporogénèse: à gauche de la photo, ascospore en voie de délimitation par un sac pro-sporal encore ouvert. *Tuber mesentericum*. Échelle: 1  $\mu$ m.

Fig. 14. — Formation du sac pro-sporal à partir d'un diverticule issu d'un lomasome et dirigé vers un noyau. *Tuber aestivum*. Échelle: 0,5  $\mu$ m.

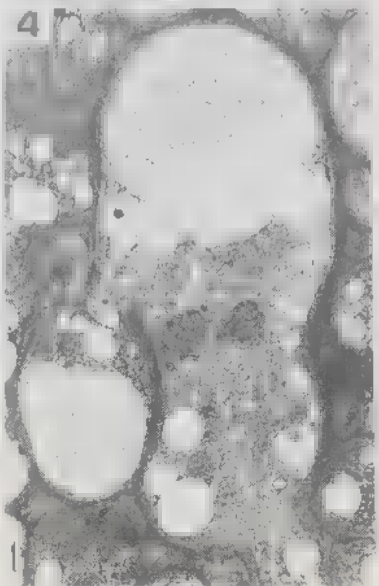
Fig. 15. — Le sac post-sporal (flèche) sépare l'épipleme externe, bourré de glycogène, de l'épipleme interne, dans lequel est visible une ascospore en voie de maturation. *Tuber melanosporum*. Échelle: 2  $\mu$ m.

Fig. 16 et 17. — Détails du sac post-sporal (flèches). En 17, les constituants épiplematiques sont bien visibles ainsi qu'un volumineux globule sur la face externe du sac. 16: *Tuber rufum*; 17: *Tuber aestivum*. Échelle: 1  $\mu$ m.

Fig. 18 et 19. — Détail du sac post-sporal (flèches), montrant des résidus de lyse accumulés sur la face externe. 18: *Tuber bituminatum*; 19: *Tuber dryophilum*. Échelle: 1  $\mu$ m.

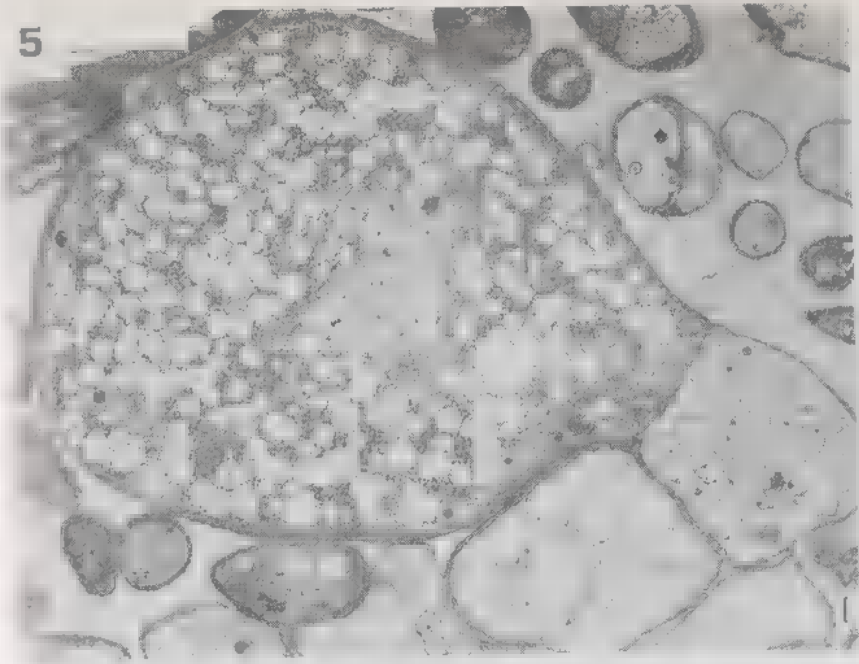
Fig. 20 et 21. — Détails du sac post-sporal. En 20, accolement d'éléments du réseau endoplasmique, permettant l'allongement du sac. En 21, mise en évidence de la structure des globules associés au sac. 20: *Tuber rufum*; 21: *Tuber melanosporum*. Échelle: 0,5  $\mu$ m.

Fig. 22 et 23. — Détails du sac post-sporal. En 22, participation des ampoules du réseau endoplasmique à la formation des globules du sac. En 23, le sac post-sporal demeure partiellement visible alors que l'épipleme a dégénéré. 22: *Tuber rufum*; 23: *Tuber melanosporum*. Échelle: 0,5  $\mu$ m.

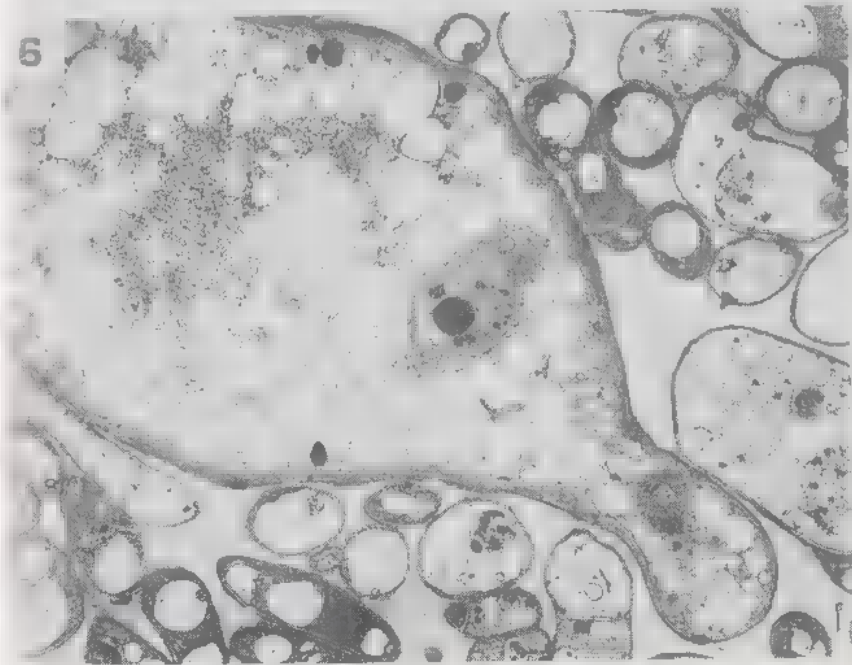


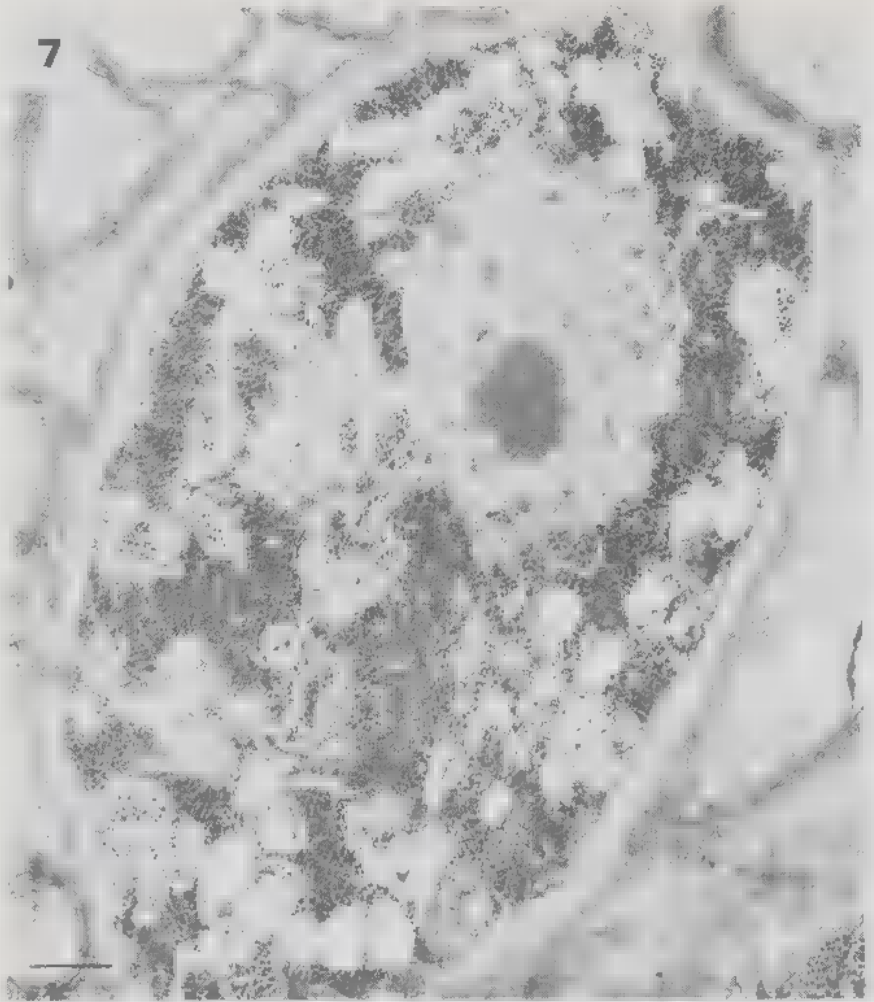


5



6

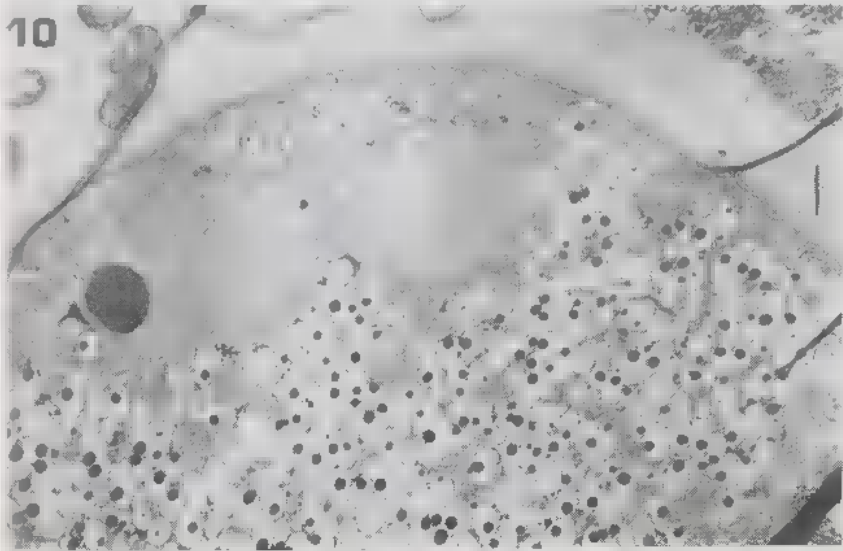


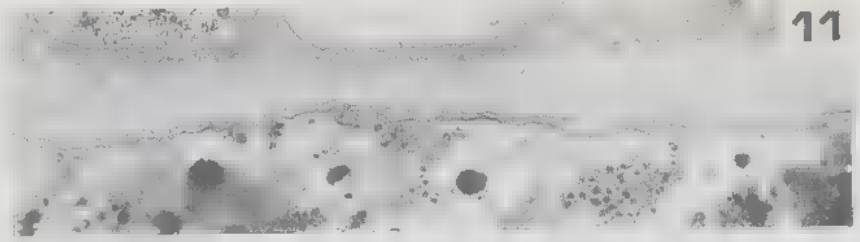


9

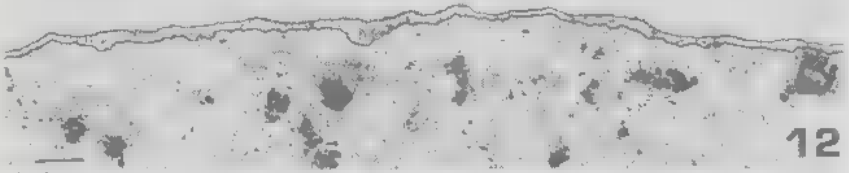


10

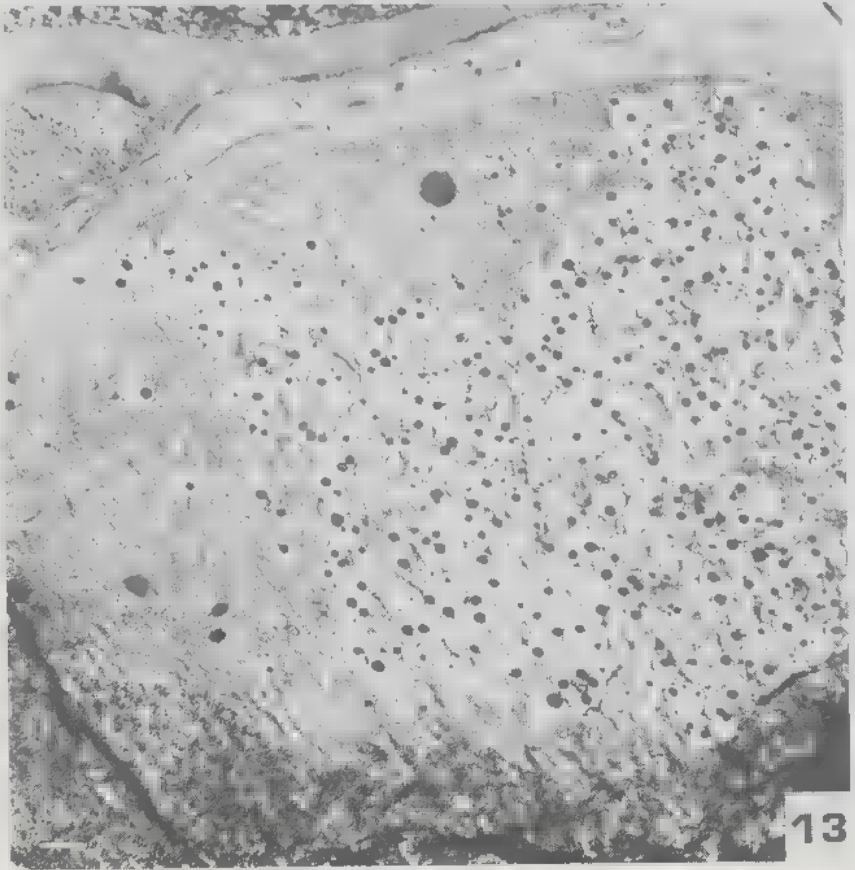




11

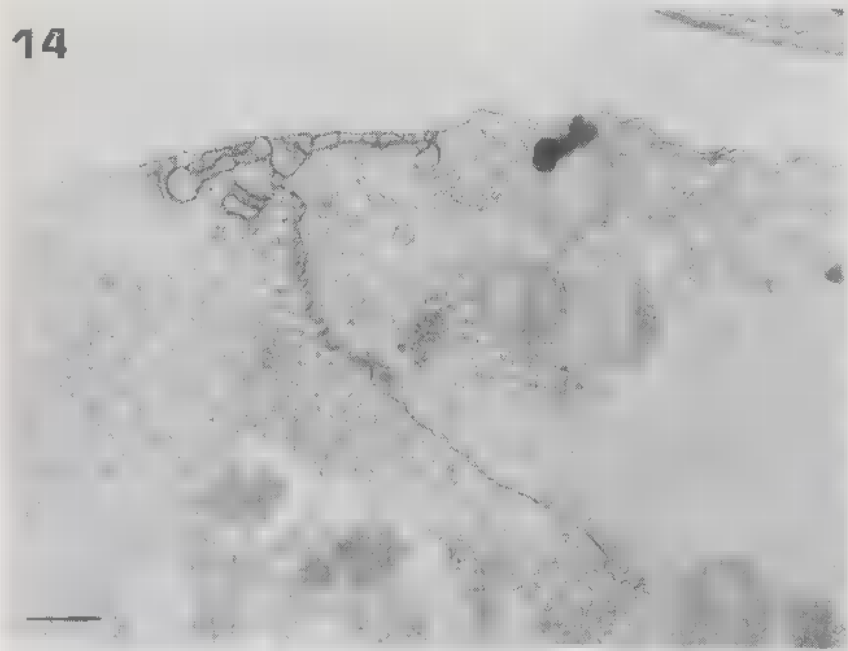


12

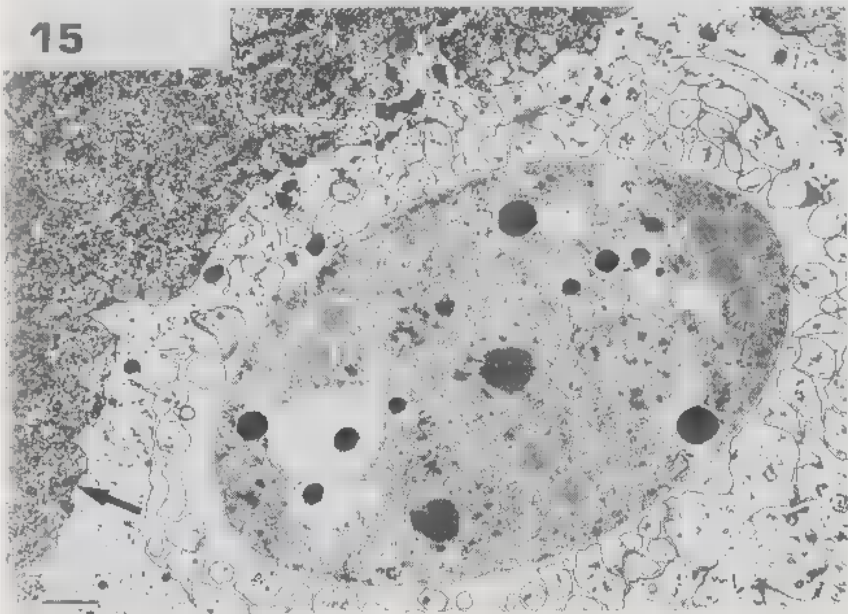


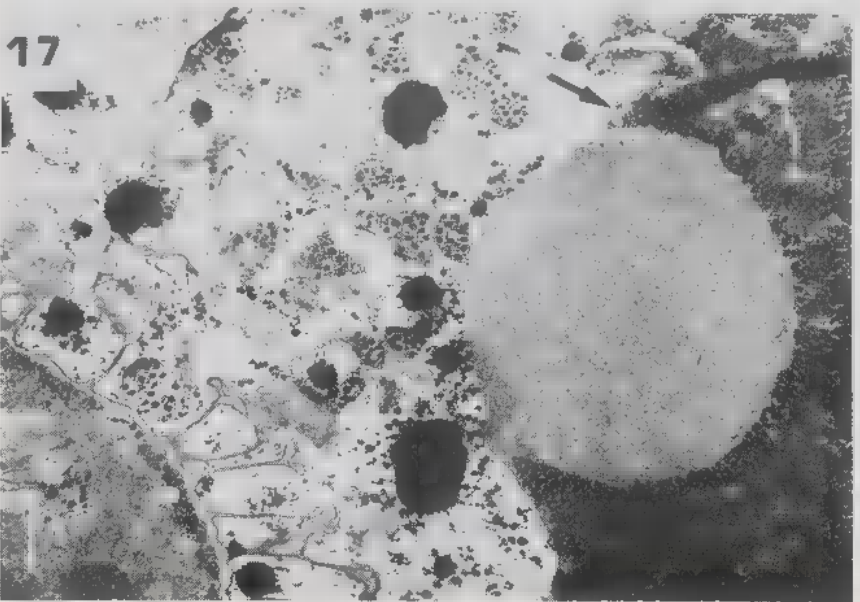
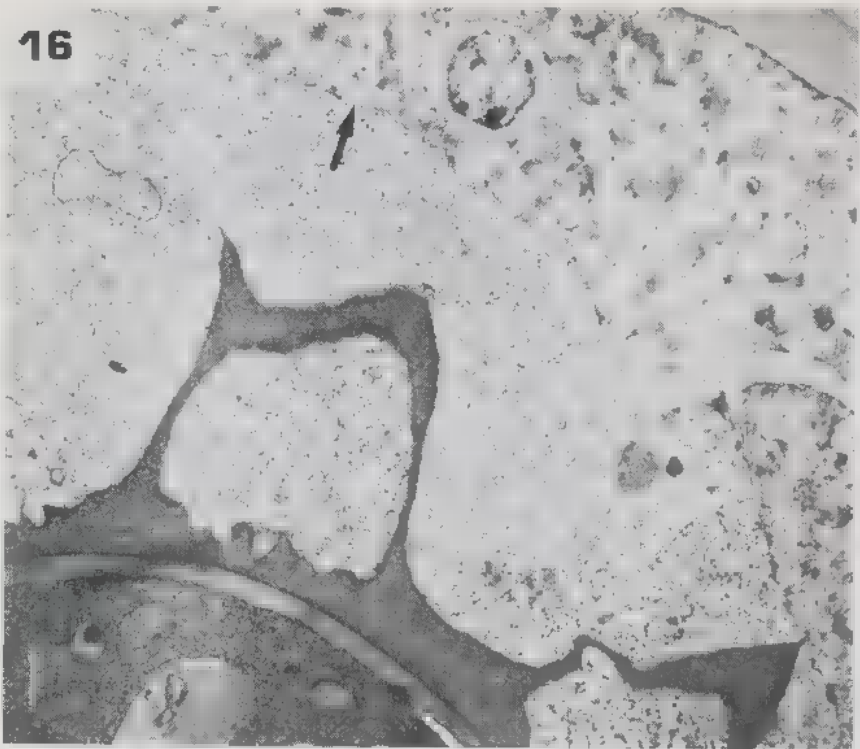
13

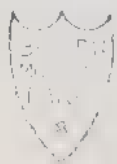
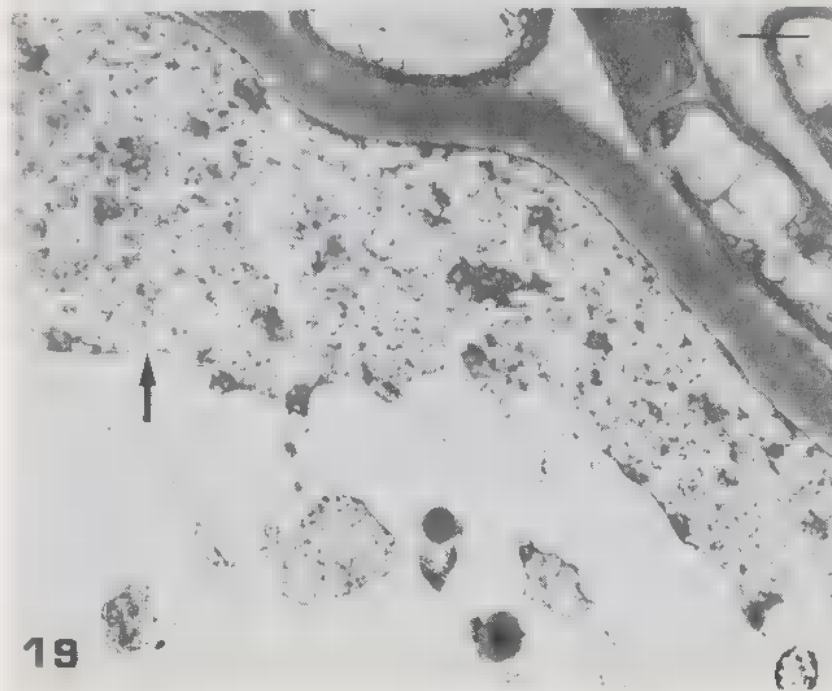
14



15

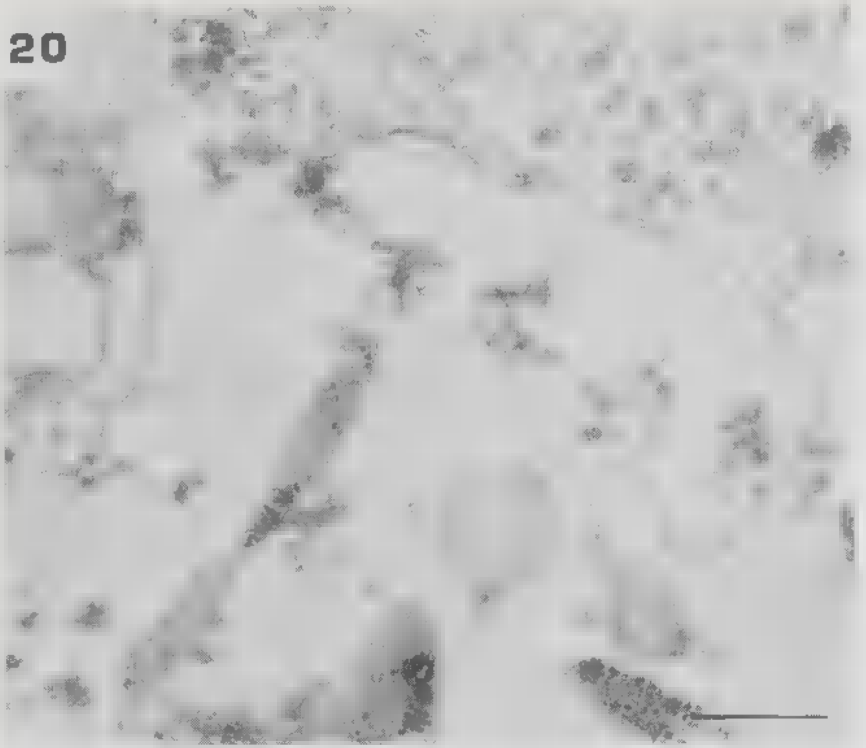




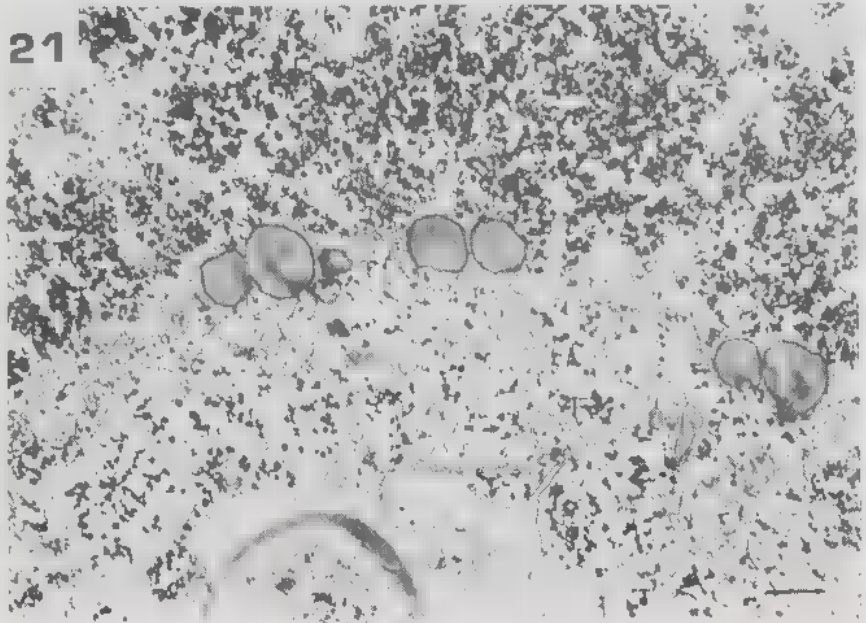




20

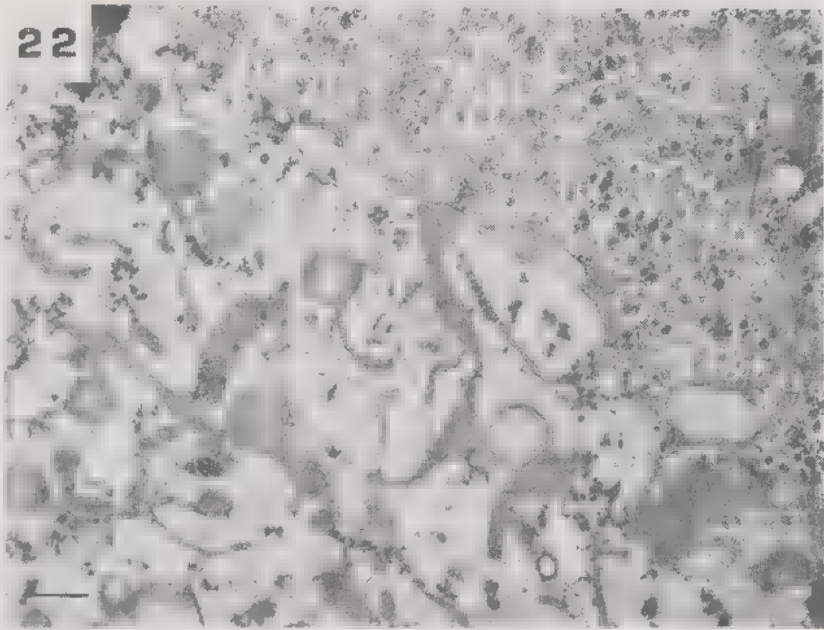


21





22



23

